

**Többszörösen módosított szerkezetű új endomorfín
analógok tervezése, szintézise és farmakológiai
jellemzése**

Ph.D. Értekezés tézisei

Jayapal Reddy Mallareddy

**Témavezető
Dr. Tóth Géza**

Kémiai Doktori Iskola

**Magyar Tudományos Akadémia, Szegedi Biológiai Kutatóközpont, Biokémiai
Intézet**

**Szeged
2012**

1. Bevezetés

Az opioidok kutatásának fő célja hatékony fájdalomcsillapítók kifejlesztése, amelyek az opiátok káros mellékhatásait (fizikai függőség, tolerancia és légzés depresszió) kiküszöbölhetik és hatékonyan helyettesíthetik a morfint. Marha agyból majd később humán agyból izolált két endogén peptid, endomorfín-1 és -2 (EM-1, H-Tyr-Pro-Trp-Phe-NH₂; EM-2, H-Tyr-Pro-Phe-Phe-NH₂) nagy affinitással és szelektivitással kötődik a μ -opioid receptorokhoz. Mivel az endomorfínok nagy affinitással kötődnek a μ -opioid receptorokhoz, és ezen receptorok felelősek a fájdalomérzékelésért és modulációjáért, ezen tetrapeptidek fontos modellek lettek a fájdalomcsillapítók kifejlesztésének kutatásában. Az endomorfínok használatát számos tényező befolyásolja, pl. rövid hatástartam, hatástalan ok *per os* adagolás esetén, a kotlátozoth vér-agy gáton való átjutások és a proteolitikus enzimekkel szemben metabolikus stabilitásuk gyenge. A korlátozó tényzők leküzdése érdekében több nem természetes aminosavval (Dmt¹, *cisz*-(1*S*,2*R*)Ahc²/*cisz*-(1*R*,2*S*)Ahc², *cisz*- Δ (1*S*,2*R*)Apc², *cisz*- Δ (1*S*,2*R*)Ahc², Hyp², β Pro², (2*R*,3*R*) β MePhe⁴/(2*S*,3*S*) β MePhe⁴) szubsztituált endomorfín analógot szintetizáltunk. Az így szubsztituált endomorfín analógok a proteolitikus stabilitás növekedéséhez vezettek, miközben megtartották vagy növelték azok biológiai aktivitását.

2. Célkitűzés

Kutatásunk fő célja olyan endomorfín analógok kifejlesztése, ahol a proteolitikus enzimekkel szemben ellenállóbb, és az eredeti endomorfínokhoz hasonló, vagy hatékonyabb biológiai aktivitással rendelkező analógokhoz jutunk.

Célunk volt:

Dmt¹, Ahc², Δ Ahc²/ Δ Apc², β Pro², Hyp², β MePhe⁴ és pFPhe⁴ nem természetes aminosavakat tartalmazó endomorfín származékok előállítás. Meghatározni az új analógok biológiai affinitását és szelektivitását radioreceptor kötési vizsgálatokkal. Megvizsgálni az új analógok funkcionális tulajdonságait [³⁵S]GTP γ S kötési vizsgálatokkal. A receptor kötési és funkcionális vizsgálatok alapján kiválasztott analógok közül. A leghatékonyabb peptidek stabilitását vizsgálni proteolitikus enzimekkel (dipeptidyl peptidase IV, carboxypeptidase Y, Amino peptidases etc) szemben. Triciált endomorfín származékokat alkalmaztunk vér-agy gáton való átjutás

vizsgálatokhoz. A leghatékonyabb endomorfín-2 analógokat *in vivo* krónikus ízületi fájdalom modelben spinális szinten vizsgálni az anti-allodinikus hatások felderítésére.

3. Alkalmazott módszerek

3.1. Peptid szintézis, tisztítás és azonosítás

A peptid szintézist Boc védőcsoporttal ellátott aminosavakkal 4-Metil-benzhidrilamin gyantán, szilárd fázisú peptidszintézis módszerével valósítottuk meg. A nyers peptideket RP-HPLC kromatográfiával tisztítottuk. A vegyületek azonosítása tömegspektroszkópiával, HRMS/ESI-MS módszerrel történt.

3.2. Radioligandum kötési vizsgálatok

[³H]DAMGO (1 nM, 25°C, 1 h, GF/C filter, üvegcső), and [³H]Ile^{5,6}-deltorfin-2 (2 nM, 35°C, 45 min., GF/B filter, plastic cső) radioligandumokat alkalmaztunk μ és δ opioid receptor affinitások méréséhez..

3.3. Ligandum-stimulálta [³⁵S]GTP γ S kötési teszt

Az új analógok agonista or antagonistá tulajdonságait vizsgáltuk ezzel a módszerrel.

3.4. Stabilitási vizsgálatok

Az új peptidek stabilitását proteolitikus enzimekkel (dipeptidil peptidáz IV, karboxipeptidáz Y, amino peptidáz etc.) szemben patkány agy homogenátumon vizsgáltuk.

Minden biológiai assay-t (módszer 3.2 - 3.4) patkány agy preparátumon mértük. .

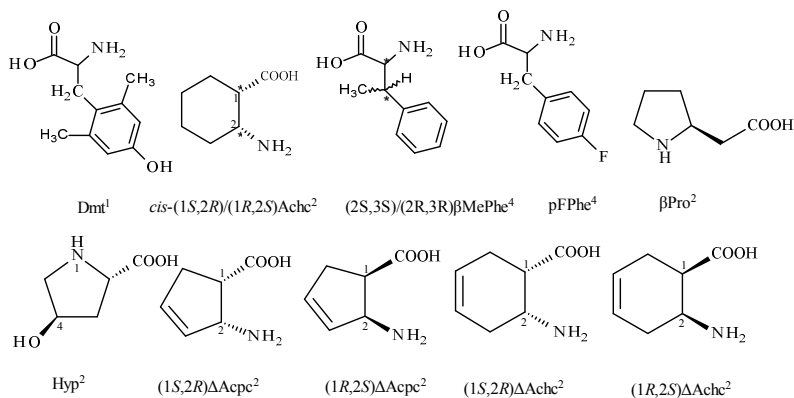
3.5. n-Octanol/víz megoszlási hányados

Az új analógok hidrofobicitását vizsgáltuk HPLC kromatográfiával így meghatároztuk a peptid koncentrációt a két fázisban.

4. Eredmények és azok megbeszélése

A peptid szintézist Boc védőcsoporttal ellátott aminosavakkal 4-metilbenzhidrilamin gyantán, szilárd fázisú peptidszintézis módszerével valósítottuk meg. Az új endomorfín analógok hatékonyságának és szelektivitásának elemzése patkány agyi membránpreparátumon radioligand-kötési teszttel történt. A μ -receptor affinitás méréshez [^3H]DAMGO-t, míg a δ -receptor affinitás méréshez [^3H]Ile^{5,6}-deltorphin II-t használtunk. Az új vegyületek koncentráció függő módon versengtek a radiojelzett μ - és δ -receptor ligandumokkal a receptor kötési helyekért. [^{35}S]GTP γ S mérésekkel határoztuk meg a ligandumok funkcionális tulajdonságait.

A receptor kötési vizsgálatok analízise kimutatta hogy mindkét endomorfín esetében a (1*S*,2*R*)Achc² és a (2*S*,3*S*) β MePhe⁴ együttes használata az eredeti peptidekhez képest hasonlóan potens analógokhoz vezetett. A kapott eredmények alátámasztották, hogy a Dmt¹ szubsztitúció fokozza a μ -opioid receptor affinitást, miközben csökkenti a ligandumok szelektivitását. A (2*R*,3*R*) β MePhe⁴-al szubsztituált analóg kisebb affinitást mutatott, mint a másik izomer a (2*S*,3*S*) β MePhe⁴ tartalmú peptid. Az Achc² és a pFPhe⁴ együttes szubsztitúciója olyan analógokat eredményezett, melyek bioaktivitása az aliciklikus β -aminosavak kiralitásától függött. Az összes analóg közül a Dmt¹, (1*S*,2*R*)Achc², pFPhe⁴-endomorfín-2 rendelkezett a legnagyobb μ -opioid receptor affinitással ($K_i = 0.13 \text{ nM}$).



Hyp² szubsztitúció csökkentette μ -opioid receptor affinitást ($K_i = 44 \text{ nM}$), A β Pro² tartalmú analóg alacsonyabb affinitáshoz vezetett ($K_i = 27 \text{ nM}$) az eredeti endomorfín-2 – höz képest ($K_i = 1.35 \text{ nM}$). A peptidgerinc CH₂-csoporttal való meghosszabítása (β Pro), a

Pro terciér amid molekularész megőrzése mellett, nem előnyös az endomorfín-2 μ -receptor aktivitására. A β Pro² szubsztitúció esetében észlelt hatás nem biztos hogy általánosan alkalmazható minden μ -receptor ligandumra, mivel egy korábbi vizsgálat során a β Pro-endomorfín-1 a DAMGO-hoz és az endomorfín-1-hez hasonló μ -receptor affinitást, "efficacy" profilt és agonista karaktert mutatott. A -CH₂-csoport beillesztése a pirrolidin gyűrű és a kboxil csoport közé (β Pro) az endomorfínban, másképpen befolyásolja a receptor-ligandum kölcsönhatást, ha a következő aminosav Trp vagy Phe. A *cisz*-(1*S*,2*R*) Δ Acpc²/*cisz*-(1*S*,2*R*) Δ Ahc² tartalmú analógok az eredeti endomorfín-2-höz hasonló affinitást mutattak. A telítetlen aliciklikus β -aminosav tartalmú endomorfín analógok kötési affinitása összehasonlítható a telített β -aminosav tartalmú endomorfín analógokéval. A *cisz*-(1*S*,2*R*) Δ Acpc²-endomorfín-2 azonos affinitást ($K_i = 1.3$ nM) és nagyobb μ -opioid receptor szelektivitást mutatott a eredeti peptidhez képest.

A heterológ leszorítási kísérletek eredményei alapján választottuk ki a lepotensebb analógokat a [³⁵S]GTP γ S mérésekhez. A potencia (EC₅₀) és a hatásfok (efficacy, E_{max}) értékeket a tiszta agonista DAMGO értékeihez hasonlítottuk. A vegyületek dózis függő módon stimulálták a funkcionális [³⁵S]GTP γ S kötést. Az endomorfín-1 és az endomorfín-2 a DAMGO-hoz hasonló EC₅₀ értéket, de alacsonyabb hatásfokot mutat, mely alátámasztja hogy az endomorfínok parciális agonisták. A *cisz*-(1*S*,2*R*) Δ Acpc², *cisz*-(1*S*,2*R*) Δ Ahc², (1*S*,2*R*)Ahc², és (2*S*,3*S*) β MePhe⁴ tartalmú analógok nagyobb hatásfokot mutattak, tiszta agonistaként viselkednek. Hyp² szubsztitúció az endomorfín-2-ben alacsonyabb hatásfokot eredményezett, mely mérsékelt agonista hatást sugall. A β Pro² tartalmú analóg szolgáltatja a legalacsonyabb hatásfokot, gyenge agonistaként viselkedik. A naloxon jelenlétében elvégzett [³⁵S]GTP γ S mérések eredménye kimutatta hogy a ligandumok opioid receptorokon keresztül aktiválják a G-proteineket.

A biológiai aktivitási eredmények alapján a hatékony analógokon stabilitási vizsgálatokat végeztünk patkányagyi membrán preparatumon. Az (1*S*,2*R*)Ahc² tartalmú analógok felezési ideje (>20 óra) jelentősen emelkedett az eredeti endomorfínok felezési idejéhez ($t_{1/2} = 5-7$ perc) képest, mely az új analógok enzim rezisztenciáját bizonyítja. Az endomorfín-2 esetében a Hyp² szubsztitúció 3x-os, a β Pro² beépítése 6x-os növekedést eredményezett a proteolitikus stabilitásban az eredeti vegyülethez képest. Ezen

eredmények alátámasztják, hogy az aliciklikus β -aminosavak beépítése proteolitikusan stabil analógokhoz vezet.

Laboratóriumunkban számos triciált endomorfín-, és neuropeptid analógot állítottunk elő, különböző biokémiai vizsgálatokhoz. A tríciummal jelzett radioaktív peptidek előnye, hogy a radioaktív anyag szerkezete megegyezik az eredeti peptidével, így a biológiai aktivitásuk is hasonló. A triciált ligandumokat felhasználtuk prekursor proteinek bioszintetikus útvonalának keresésére és homológ vagy heterológ leszorítási kísérletekben az új analógok biológiai jellemzésére.

A leghatékonyabb endomorfín-2 analógokat *in vivo* krónikus izületi fájdalom modelben spinális szinten vizsgáltuk az anti-allodinikus hatások felderítésére. Az allodynia egy olyan állapot, amelyben egy rendszeren nem fájdalmas inger, fájdalmat vált ki. Morfint használtunk kontrollnak. Az összes analóg koncentráció függő módon váltott ki antinociceptív hatást. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a Dmt, az aliciklikus β -aminosavak, a β MePhe, és a pFPhe aminosavak beépítése az endomorfín-2-ben egy ígéretes stratégia lehet a peptidek biohasznosíthatóságának növelésére, és szerepet játszhat új endomorfín analógok kifejlesztésében, melyek fokozott terápiás lehetőséggel bírnak. Mindamellettt további vizsgálatok szükségesek ezen ligandumok lehetséges mellékhatásainak felderítésére.

Korábbi eredmények alapján ismert hogy az endomorfínok hatékony, nagy szelektivitású μ -opioid receptor agonisták. A gyenge metabolikus stabilitás és a korlátozott vér-agy gáton való átjutás, mind eimitálja a fájdalom klinikai kezelését endomorfínok szisztémás adásával. Az endomorfín-1-ben és endomorfín-2-ben végrehajtott számos ígéretes szerkezeti módosítás megnövekedett antinocicepcióhoz vezetett, melyet a peptid perifériás beadása után észleltek, ez a hatás a jobb vér-agy gát permeabilitásnak vagy a megnövekedett degradáció elleni rezisztenciának vagy mindkettőnek tulajdonítható. A vizsgált endomorfín-2 analógok [Dmt-Pro-Phe-Phe-NH₂, Tyr-(1*S*,2*R*)Acpc-Phe-Phe-NH₂, Tyr-(1*S*,2*R*)Achc-Phe-Phe-NH₂] viszonylag alacsony, de jobb vér-agy-gát permeabilitást mutattak az eredeti peptidhez képest. Az agyi endotél sejtek életképességére egyik vizsgált peptid sem hatott citotoxikusan. A jobb vér-agy gát permeabilitás, az antinociceptív hatás és a megnövekedett enzimikus rezisztencia mind

azt bizonyítja hogy ezen peptidek prekuzorként szolgálhatnak opioid gyógyszerek fejlesztésében.

Az értekezés alapját képező közlemények

2011:

1. Mallareddy, J. R.; Borics, A.; Keresztes, A.; Kövér, K. E.; Tourwé, D.; Tóth, G. *Design, Synthesis, Pharmacological Evaluation, and Structure-Activity Study of Novel Endomorphin Analogues with Multiple Structural Modifications.*

Journal of Medicinal Chemistry, 54: 1462-1472.

Impakt Faktor: **5.207**

2012:

2. Mallareddy, J. R.; Tóth, G.; Fazakas, C.; Molnár, J.; Nagyősi, P.; Lipkowski A. W.; Krizbai, I.A.; Wilhelm, I. *Transport Characteristics of Endomorphin-2 Analogues in Brain Capillary Endothelial Cells.*

Chemical Biology & Drug Design, 79: 507-513.

Impakt Faktor: **2.527**

3. Tóth, G.; Mallareddy, J. R.; Tóth, F.; Lipkowski, A. W.; Tourwé, D. *Radiotracers, Tritium Labelling of Neuropeptides.*

Arkivoc, (v): 163-174.

Impakt Faktor: **1.096**

Összes impakt faktor: **8.83**

Egyébb közlemények

2011:

3. Vandormael, B.; Wachter, R. D.; Martins, J. C.; Hendrickx, P. M. S.; Keresztes, A.; Ballet, S.; **Mallareddy, J. R.**; Tóth, F.; Tóth, G.; Tourwé, D. *Asymmetric Synthesis and Conformational Analysis by NMR and MD of Aba- and α -MeAba-Containing Dermorphin Analogs.*

ChemMedChem, 6: 2035-2047.

Impakt Faktor: **3.306**

2012:

1. Németh, K.; **Mallareddy, J. R.**; Domonkos, C.; Visy, J.; Géza, T.; Péter, A. *Stereoselective Analysis of Tetrapeptide Diastereomers: Resolution of Biologically Active Endomorphin Analogues by Capillary Electrophoresis using Cyclodextrins.*

Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis (under review)

2. Kovács, G.; Petrovszki, Z.; **Mallareddy, J. R.**; Tóth, G.; Benedek, G.; Horváth, G. *Characterization of Antinociceptive Potency of Endomorphin-2 Derivatives with Unnatural Amino Acids.*

Acta Physiologica Hungarica (in print)

Impakt Faktor: **1.226**

Összes impakt faktor: **4.532**

Kéziratok előkészítés alatt

1. Borics, A.; **Mallareddy, J. R.**; Tímári, I.; Kövér, K. E.; Keresztes, A.; Tóth, G. The Effect of Pro² Modifications on the Structural and Pharmacological Properties of Endomorphin-2.

2. Tóth, F.; Kleczkowska, P.; Lipkowski, A. W.; **Mallareddy, J. R.**; Tourwé, D.; Tóth, G.; Bojnik, E.; Benyhe, S. Synthesis and Binding Characteristics of a Neurotensin-like Peptide: [³H]Neuromedin-N.

Előadások

1. **Mallareddy, J. R.**; Borics, A.; Keresztes, A.; Tóth, G. “Design and Synthesis of Pharmacologically Active Endomorphins” in Annual Meeting of the Peptide Committee of the Hungarian Academy of Sciences, **Balatonszemes**, Hungary. (2011)
2. **Mallareddy, J. R.** “Effects of Unnatural Amino Acids on Bioactivity of Endomorphins” in **Young Organic Chemist** symposium organized by University of Szeged, Szeged, Hungary. (2011)
3. **Mallareddy, J. R.** “Design, Synthesis and Biological Evaluation of Chemically Multiple Modified Endomorphins” in **Young Organic Chemist** symposium organized by Department of Chemistry, University of Szeged, Szeged, Hungary. (2010)
4. **Mallareddy, J. R.**; Keresztes, A.; Tóth, G. “Investigations of Endomorphin-2 Biosynthesis” in Annual Meeting of the Peptide Committee of the Hungarian Academy of Sciences, **Balatonszemes**, Hungary. (2010)

Posterek

1. **Mallareddy, J. R.**; Borics, A.; Keresztes, A.; Tóth, G. Influence of Proline Mimetics on Bioactivity of Endomorphin-2. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, Hungary. (2011) P170
2. Tóth, F.; Kleczkowska, P.; Lipkowski, A. W.; **Mallareddy, J. R.**; Tóth, G.; Tomboly, Cs.; Bojnik, E.; Borsodi, A.; Benyhe, S. *Synthesis and Binding Characteristics of a Neurotensin-like Peptide: [³H]Neuromedin N*. International Society for Neurochemistry, Athens, Greece. (2011)
3. Tóth, G.; **Mallareddy, J. R.**; Tóth, F.; Lipkowski, A. W.; Tourwé, D. Radiotracers-Tritium Labelled Neuropeptides. 4th European Conference on Chemistry for Life Sciences, Budapest, Hungary. (2011) P175
4. **Mallareddy, J. R.**; Borics, A.; Keresztes, A.; Tóth, G. Design, Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Endomorphin analogues with Multiple Structural Modifications. 8th European Opioid Conference, Krakow, Poland. (2011) PS I – 7

5. Tóth, G.; **Mallareddy, J. R.**; Borics, A.; Kövér, K. E.; Keresztes, A. Design, Synthesis and Biological Evaluation of Novel Endomorphins with Multiple Structural Modifications. Proceedings of 31st European Peptide Symposium, European Peptide Society, Copenhagen, Denmark. Page 454-455. (2010)

6. Tomczyszyn, A.; Lipkowski, A. W.; Toth, G.; Keresztes, A.; **Mallareddy, J. R.**; Misicka, A. Synthesis of Tritiated Ligand for Binding Assays to Tachykinin Receptors. 20th Polish Peptide Symposium, Wladyslawowo, Poland. (2010)

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom hogy a jelölt téziseit, valamint az itt felsorolt, a dolgozat alapját képező publikációk egyikét sem használtam fel, és a jövőben sem használok fel tudományos fokozat megszerzésére.

Mallareddy, J. R.; Tóth, G.; Fazakas, C.; Molnár, J.; Nagyőrszi, P.; Lipkowski, A. W.; Krizbai, I.A.; Wilhelm, I. *Transport Characteristics of Endomorphin-2 Analogues in Brain Capillary Endothelial Cells*. Chem. Biol. Drug Des. **2012**, 79, 507-513.

Tóth, G.; **Mallareddy, J. R.**; Tóth, F.; Lipkowski, A. W.; Tourwé, D. *Radiotracers, Tritium Labelling of Neuropeptides*. Arkivoc, **2012**, (v), 163-174.

Fazakas Csilla
Judit Molnár
Péter Nagyőrszi
Dr. Fanni Tóth
Dr. István A. Krizbai
Dr. Imola Wilhelm
Dr. Géza Tóth